



**WYDZIAŁ BIOLOGII
i OCHRONY ŚRODOWISKA**
Uniwersytet Łódzki

mgr Monika Toma

Stacjonarne studia Doktoranckie Genetyki
Molekularnej, Cytogenetyki i Biofizyki Medycznej

Syntetyczna letalność w komórkach nowotworowych indukowana inhibitorami białek naprawy pęknięć DNA.

Synthetic lethality of cancer cells induced by
inhibitors of proteins participating in DNA repair.

Praca doktorska wykonana
w Katedrze Genetyki Molekularnej
pod kierunkiem

- Prof. dr hab. Tomasza Śliwińskiego

Streszczenie

Wstęp

Jedną z cech charakterystycznych nowotworów jest ich genetyczna niestabilność, która prowadzi do podwyższonego tempa powstawania mutacji w ich genomach [1]. Z tego też powodu istnieje względnie wysokie ryzyko zajścia mutacji i utraty funkcji w genach, których produkty biorą udział w szlakach kluczowych dla przeżycia komórki - np. mechanizmach naprawy DNA. W takich warunkach przeżycie komórki nowotworowej zostaje uzależnione od znalezienia substytutu utraconego mechanizmu i aktywacji szlaku alternatywnego [2]. Jeśli inaktywujące mutacje powstające w określonych parach genów prowadzą do śmierci komórek, natomiast inaktywacja każdego z nich indywidualnie nie wpływa na przeżycie komórek, mówimy wówczas, że wykazują one interakcje syntetycznej letalności [3]. Zastosowanie inhibitorów lub aptamerów białek w celu zablokowania szlaku alternatywnego stało się w ostatnich latach przedmiotem spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej opartej o syntetyczną letalność. Takie podejście może nie tylko okazać się selektywnym i skutecznym rozwiązaniem w spersonalizowanej terapii przeciwnowotworowej, ale przyczynia się już obecnie do poszerzania wiedzy dotyczącej interakcji genetycznych zachodzących w komórkach [4].

Powstawanie pęknięć dwuniciowych DNA (DSB - ang. *double strand breaks*) w komórkach może być spowodowane ekspozycją na promieniowanie jonizujące, reaktywne formy tlenu czy stres genotoksyczny wywołany np. chemoterapeutykami [5]. Nienaprawione DSB mogą prowadzić do powstawania rearanżacji genetycznych i progresji nowotworu. Przypuszcza się, że mutacje genów biorących udział w naprawie tego rodzaju uszkodzeń oraz aktywacja alternatywnych systemów naprawy może być źródłem oporności komórek nowotworowych na stres genotoksyczny [6]. W komórkach prawidłowych naprawa DSB przebiega poprzez szlak łączenia końców niehomologicznych (NHEJ) w fazie G1/S cyklu komórkowego lub poprzez mechanizm naprawy przez homologiczną rekombinację (HR) w późnej fazie S i G2. Dodatkowo można wyodrębnić dwa podsystemy - podstawowy i alternatywny zarówno dla NHEJ, jak i dla HR. Szlak podstawowy NHEJ - cNHEJ zależny jest od białka DNA-PKcs, natomiast, jeśli nie działa on prawidłowo, jego funkcje są przekierowywane do szlaku altNHEJ opartego na białku PARP1 [7]. Poza naprawą DSB

PARP1 bierze udział również w naprawie pęknięć jednoniciowych DNA, a także indukuje HR na zatrzymanych widelkach replikacyjnych [8]. Naprawa poprzez HR zachodzi przy współdziałaniu białek BRCA1/2 oraz RAD51, jednak zauważono, że w komórkach z mutacjami w genach *BRCA1/2* może dochodzić do aktywacji szlaku alternatywnego, w którym zostają one zastąpione białkiem RAD52 [6]. Mutacje utraty funkcji w genach szlaków podstawowych mogą stwarzać warunki do selektywnej eliminacji komórek nowotworowych wykorzystując inhibitory szlaków alternatywnych. Na obecną chwilę jedynie inhibitory PARP1 znalazły zastosowanie w spersonalizowanej terapii opartej o syntetyczną letalność. Inhibicja PARP1 w komórkach z mutacjami *BRCA1/2* prowadzi do nieskutecznej naprawy uszkodzeń DNA w mechanizmach zależnych od PARP1 i inwersji uszkodzeń do DSB, które z kolei nie mogą zostać wydajnie naprawione przez szlak HR. Może to dalej prowadzić do akumulacji DSB, pogłębiania niestabilności genetycznej i śmierci komórki [9]. Pomimo, że to szlak NHEJ jest głównym szlakiem naprawy w komórkach eukariotycznych, to niektóre typy nowotworów wydają się znacznie bardziej polegać na HR, dlatego jego inaktywacja może wywierać silnie toksyczny wpływ na komórki rakowe [10].

W niniejszej pracy podjęto się poszukiwania kolejnych interakcji syntetycznej letalności w komórkach źle prognozujących guzów litych - glejaka i czerniaka. Pomimo, że czerniak na wczesnych etapach łatwo poddaje się leczeniu, to wyższe stopnie zaawansowania i przerzuty do innych organów zazwyczaj znacząco pogarszają medianę przeżycia poniżej 9 miesięcy [11]. Glejak wielopostaciowy jest natomiast jednym z najczęstszych nowotworów centralnego układu nerwowego, jednak nawet pomimo wykorzystania agresywnych strategii terapeutycznych wykazuje bardzo niski współczynnik przeżywalności (mediana 14.6 miesięcy) [12]. Badania zakładały utworzenie dla każdego badanego przypadku profilu ekspresji genów kluczowych dla naprawy DSB i identyfikację "słabych punktów" naprawy w nowotworze, które mogłyby zostać wykorzystane do stworzenia spersonalizowanego do każdego przypadku zestawu związków celujących w alternatywne szlaki naprawy DSB.

Cel pracy

Celem niniejszej pracy było badanie odpowiedzi linii pierwotnych glejaka i czerniaka wykazujących obniżoną ekspresję białek biorących udział w naprawie DSB na zastosowanie inhibitorów alternatywnych szlaków naprawy. Cel ten osiągnięto poprzez:

1. Wyprowadzanie linii pierwotnych źle prognozujących guzów litych od pacjentów oraz potwierdzanie charakterystyki otrzymanej linii komórkowej poprzez zastosowanie markerów powierzchniowych i genetycznych;
2. Określenie poziomu ekspresji genów, których produkty biorą udział w naprawie DSB (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, homologi *RAD51*, *RAD52* - HR; *DNA-PKcs*, *XRCC5*, *XRCC6*, *LIG4* - cNHEJ; *PARP1*, *LIG3* - altNHEJ) i odniesienie ich poziomu do ekspresji w komórkach prawidłowych, co pozwoli na identyfikację “słabych punktów” w systemach naprawy DSB w komórkach nowotworowych i dobranie inhibitorów, które mogłyby doprowadzić do zajścia syntetycznej letalności;
3. Ocena aspektów odpowiedzi komórek nowotworowych i prawidłowych po zastosowaniu dobranych inhibitorów zastosowanych samodzielnie lub w kombinacji ze związkami alkilującymi stosowanymi obecnie w terapii wybranych do badań typów nowotworów.

Przeprowadzone badania pozwolą na poszukiwanie korelacji pomiędzy profilem ekspresji genów kodujących białka DSB, a wrażliwością na podejście oparte o syntetyczną letalność w komórkach nowotworowych.

Materialy i metody

Materiał do badań stanowiły linie pierwotne czerniaka i glejaka. Wycinki czerniaka sklasyfikowane histopatologicznie jako stadia kliniczne III i IV zostały pobrane od pacjentów Oddziału Chirurgii Onkologicznej Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi. Komórki czerniaka DMBC 2, DMBC 8, DMBC 10, DMBC 11, DMBC 12 zostały wyizolowane z wycinków w Zakładzie Biologii Molekularnej Nowotworów, Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, a obecność komórek nowotworowych w hodowlach została potwierdzona poprzez analizę cytometryczną markerów powierzchniowych charakterystycznych dla komórek czerniaka oraz dla komórek macierzystych nowotworowych [13]. Otrzymane przez zespół linie pierwotne czerniaka zostały nam udostępnione do dalszych badań. Komórki były hodowane w formie trójwymiarowych melanosfer, które w porównaniu do systemu hodowli “*monolayer*”, pozwalają na lepsze odwzorowanie heterogenności populacji komórek guza oraz jego trójwymiarowej struktury.

Wycinki glejaka wielopostaciowego sklasyfikowane histopatologicznie jako stadia kliniczne III i IV pobrano od pacjentów Kliniki Neurochirurgii i Chirurgii Nerwów Obwodowych, Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego im. Wojskowej Akademii Medycznej oraz Oddziału Neurochirurgii i Nowotworów Układu Nerwowego, Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego im. M. Kopernika w Łodzi. Badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr zgody RNN/194/12/KE). Komórki glejaka H3, H6 i H7 zostały wyizolowane z wycinków w Katedrze Genetyki Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego. Linie komórkowe zostały poddane sortowaniu z użyciem kulek magnetycznych MACS (ang. *magnetic-activated cell sorting*) wykrywających antygen powierzchniowy CD133, który jest markerem komórek nowotworowych macierzystych. Dodatkowo w celu potwierdzenia obecności komórek glejaka w otrzymanej hodowli przeprowadzona została analiza utraty heterozygotyczności (LOH - ang. *Loss of heterozygosity*) w locus chromosomowych 10q23-24, 10p14 i 22q12.3, których delecje uznawane są za jedne z najczęściej występujących zmian w komórkach glejaków. LOH zostały porównane między próbkami krwi obwodowej pobranej od pacjentów, a pobranymi od nich wycinkami guzów i wyprowadzonymi z nich liniami. LOH10q został wykryty we wszystkich badanych liniach, pokazując ok. 50% spadek w wycinku guza i 65-70% spadek w wyprowadzonej linii komórkowej w porównaniu do wartości w krwi obwodowej, sugerując, że mutacja 10q charakterystyczna dla glejaka została rozpropagowana w hodowli. Kontrole do eksperymentów stanowiły komercyjnie dostępne linie prawidłowych melanocytów (NHEM - ang. *Normal Human Epidermal Melanocytes*) i astrocytów (NHA - ang. *Normal Human Astrocytes*).

Analizę ekspresji genów, których produkty są zaangażowane w naprawę DSB rozpoczęto od izolacji całkowitego RNA z każdej z badanych linii. W następnym etapie został on przepisany na cDNA z wykorzystaniem reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcja łańcuchowej reakcji polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym została przeprowadzona z sondami TaqMan wykrywającymi geny *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG3*, *LIG4*, *PALB2*, *PARP1*, *PRKDC*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2*, *XRCC3*, *RAD52*, *XRCC5*, *XRCC6*, których ekspresja została znormalizowana do genu referencyjnego *18S rRNA*. *Fold change* w ekspresji genów został obliczony w porównaniu do komórek prawidłowych NHEM (dla linii czerniaków) lub NHA (dla linii glejaków). Badanie Western Blot zostało wykonane dla

wybranych z poprzedniego eksperymentu genów w celu potwierdzenia poziomu ich ekspresji na poziomie białka.

Do badań odpowiedzi komórek na zastosowane związki wybrane zostały dwie linie komórkowe każdego typu nowotworu. Decyzja o wyborze linii była podyktowana przede wszystkim poziomem ekspresji genów i białek naprawy DSB, jednak istotna była również łatwość prowadzenia hodowli i tempo wzrostu komórek. Odpowiedź komórek była badana po zastosowaniu inhibitorów PARP1 - olaparybu (AZD2281) w liniach czerniaka i talazoparybu (BMN673) w liniach glejaka, podawanych samodzielnie lub w kombinacji ze związkiem alkilującym stosowanych obecnie w terapii wybranego typu nowotworu - dakarbazyna (DTIC) w przypadku czerniaka lub temozolomid (TMZ) w glejaku. Zastosowanie kombinacji inhibitora PARP1 z DTIC lub TMZ w komórkach z obniżoną ekspresją LIG4 miało na celu zablokowanie szlaku alternatywnego altNHEJ i wytworzenie wrażliwości na uszkodzenia DNA wprowadzane przez związek alkilujący. Komórki inkubowane były ze związkami 48h, po czym część komórek pobierana była do pierwszych analiz, a pozostałe otrzymywały drugą dawkę związków, z którą inkubowane były jeszcze 72h.

Badanie wpływu badanych związków na żywotność komórek czerniaka było prowadzone poprzez wykorzystanie cytometrii przepływowej i barwienia komórek jodkiem propidyny. W komórkach glejaka przeprowadzono analizę cytometryczną po barwieniu komórek jodkiem propidyny i aneksyną V. Wykorzystanie kombinacji barwników oprócz identyfikacji martwych komórek, pozwala również na identyfikację ścieżki śmierci komórkowej. Aneksyna V wybarwia fosfatydyloserynę, która pojawia się na zewnątrz błony komórkowej na wczesnych etapach apoptozy. Jodek propidyny barwi DNA wnikając do wnętrza komórek przez pofragmentowaną błonę komórkową. Jest to zmiana charakterystyczna dla nekrozy i późnych etapów apoptozy.

W badaniach na liniach glejaka przeanalizowane zostały zmiany morfologiczne zachodzące w komórkach po inkubacji z inhibitorem PARP1 ± związkiem alkilującym. W tym celu wykorzystano mikroskopię fluorescencyjną i barwienie komórek kalceiną AM i jodkiem propidyny. Kalceina AM ma zdolność przenikania do wnętrza żywych komórek, gdzie ulega degradacji do kalceiny wykazującej po wzbudzeniu silną, zieloną fluorescencję. Jodek propidyny wybarwia DNA komórek martwych wykazujących niski stopień integralności

blony plazmatycznej. By przeanalizować wpływ związków na rozkład komórek linii glejaka i czerniaka w cyklu komórkowym przeprowadzono analizę cytometryczną po barwieniu jodkiem propidyny z dodatkiem RNazy.

Zdolność komórek nowotworowych do proliferacji była badana z wykorzystaniem testu klonogenności. Metoda testuje zdolność każdej pojedynczej komórki do przejścia podziałów i utworzenia kolonii. Komórki prawidłowe NHEM i NHA nie mają zdolności wzrostu w miękkim agarze, dlatego kontrolę stanowiły komórki nowotworowe niepotraktowane związkami.

Analiza akumulacji DSB w komórkach czerniaka została wykonana z wykorzystaniem testu ELISA wykrywającego ufosforylowany histon γ H2A.X poprzez zastosowanie specyficznych przeciwciał. W badaniach na liniach pierwotnych glejaka poziom ufosforylowanego histonu γ H2A.X był badany poprzez identyfikację cytometryczną utrwalonych komórek, które związały przeciwciało Alexa Fluor 647 Mouse Anti-H2A.X (pS139). Wyniki badań wykrywających fosforylację histonu γ H2A.X zostały potwierdzone przez wykonanie neutralnego testu kometowego, który rozpoznaje DSB.

W celu potwierdzenia hipotezy projektu komórki linii glejaka i czerniaka z obniżoną ekspresją LIG4 zostały poddane transfekcji plazmidem pCMV6-AC-GFP-LIG4, przenoszącym cDNA dla LIG4 w celu podniesienia wewnątrzkomórkowego poziomu tego białka. Kontrolę stanowiły komórki poddane transfekcji pustym plazmidem. Komórki GFP⁺ zostały wysortowane i poddane działaniu badanych związków przez 48h. Żywotność komórek była liczona po barwieniu błękitem trypanu. Kolejnym modelem były linie NALM6 rodzicielska i NALM6 LIG4^{-/-}, które zostały poddane działaniu olaparybu, a żywotność została policzona po barwieniu błękitem trypanu. Komórki glejaków z obniżoną ekspresją LIG4 i z prawidłowym poziomem LIG4 były poddawane wyciszaniu PARP1 z wykorzystaniem siRNA. Kontrolę negatywną stanowiły komórki poddane transfekcji plazmidem kontrolnym (ang. *siRNA non-targeting control*). Kontrolę pozytywną stanowił zestaw do wyciszania ekspresji genu *GAPDH* w komórkach. Po transfekcji komórek badanymi plazmidami przeanalizowany został spadek ekspresji badanych mRNA, a następnie komórki zostały poddane inkubacji z temozolomidem (TMZ) przez 48h. Komórki glejaka zostały także poddane transfekcji plazmidem pMIG-mCherry-PARP1(E988K) kodującym

dominujący negatywny mutant (E988K)PARP1 nieaktywny katalitycznie. Komórki mCherry⁺ zostały wysortowane i poddane 48h inkubacji z TMZ. Żywotność komórek po traktowaniu związkami była analizowana przez barwienie błękitem trypanu i porównanie do kontroli negatywnej.

Wyniki zostały uzyskane w trzech niezależnych powtórzeniach i przedstawione jako wartość średnia \pm SD. Wyniki zostały porównane wykorzystując niesparowany test-t Studenta. Wartości $p < 0.05$ zostały uznane za istotne statystycznie. Efekt synergistyczny związków został przeanalizowany stosując podejście addytywności odpowiedzi dwuczynnikowej analizy wariancji ANOVA (ang. *two-way ANOVA*) [14].

Przeprowadzone zostały również wstępne badania *in vivo* na myszach NSG (NOD scid gamma) ksenograftach linii pierwotnej czerniaka DMBC11. Komórki zostały podane podskórnym, a kiedy zaobserwowano wzrost guzów, rozpoczęto podawanie związków. Badania zostały przeprowadzone na 4 grupach oznaczających warianty podawanych związków (kontrola, olaparyb, DTIC, olaparyb + DTIC) - po 6 myszy na grupę.

Wyniki

Analiza ekspresji genów, których produkty biorą udział w naprawie DSB wykazała obniżony poziom *LIG4* w komórkach czerniaka, w porównaniu do komórek prawidłowych melanocytów NHEM. *LIG4*, wraz z partnerem w oddziaływaniach - *XRCC4*, przeprowadza łączenie końców w cNHEJ. Jej obniżony poziom może prowadzić do niewydajnej naprawy DSB przez szlak kanoniczny i aktywacji szlaku altNHEJ.

W celu zablokowania mechanizmu alternatywnego wykorzystany został inhibitor PARP1 - olaparyb. Kombinacja inhibitorów PARP1 i DTIC - miała natomiast na celu wzmocnienie efektu zablokowania altNHEJ i wytworzenia wrażliwości na uszkodzenia wprowadzane przez związek alkilujący. Do badań odpowiedzi komórek wybrane zostały dwie linie - DMBC 11 i DMBC 12. Barwienie komórek jodkiem propidyny i ich analiza cytometryczna wykazały specyficzną eliminację komórek czerniaka po zastosowaniu olaparybu razem z DTIC. Po 48h inkubacji jedynie kombinacja związków powodowała spadek żywotności komórek czerniaka. Podanie drugiej dawki i inkubacja przez kolejne 72h spowodowała spadek żywotności po samodzielnym zastosowaniu olaparybu lub DTIC, jak i

prowadziło do dalszego spadku liczby żywych komórek po dodaniu kombinacji. Takie samo traktowanie prawidłowych melanocytów NHEM nie przyniosło efektu toksycznego nawet po 5-dniowej inkubacji.

Badanie rozkładu komórek w fazach cyklu komórkowego nie wykazało znaczących zmian w jego przebiegu po inkubacji z badanymi związkami, za wyjątkiem niewielkiego wzrostu populacji komórek w fazie G2/M po traktowaniu kombinacją związków.

Badanie zdolności komórek czerniaka do proliferacji wykazało niemal zupełne zatrzymanie podziałów komórek potraktowanych inhibitorami PARP1 w kombinacji z DTIC. Związki zastosowane samodzielnie prowadziły jedynie do obniżenia podziałów o ok. 30-45%.

Poziom ufosforylowanego histonu γ H2A.X, który jest markerem przebiegającej naprawy DSB, nie ulegał zmianie w komórkach prawidłowych melanocytów NHEM potraktowanych inhibitorem PARP1 i DTIC samodzielnie i w kombinacji, jednak w komórkach linii czerniaka DMBC11 i DMBC 12 kombinacja prowadziła do odpowiednio 5- i 2-krotnego wzrostu liczby DSB. Akumulacja DSB w komórkach czerniaka była jeszcze bardziej znacząca w wyniku testu kometowego w warunkach neutralnych.

Badania *in vivo* przeprowadzone na ksenograftach pierwotnej linii czerniaka w myszach NSG pozwoliły zaobserwować niewielką, jednak istotną statystycznie redukcję masy guza po zastosowaniu związków. Badania te zostały potraktowane jako wstępne, a otrzymanie silniejszego efektu może wymagać dalszej optymalizacji protokołu.

Założenie, że eliminacja komórek czerniaka jest spowodowana przez interakcje syntetycznej letalności między LIG4 a PARP1, zostało zweryfikowane poprzez podwyższenie ekspresji LIG4 w komórkach czerniaka z wykorzystaniem wektora plazmidowego przenoszącego cDNA dla LIG4. Komórki wzbogacone w LIG4 wykazywały obniżoną wrażliwość na olaparyb w porównaniu do komórek poddanych transfekcji plazmidem kontrolnym. Dodatkowo, komórki białaczkowe NALM6 z knockout'em LIG4^{-/-} wykazywały znacznie większą wrażliwość na zastosowanie olaparybu niż komórki rodzicielskie posiadające LIG4.

Badanie poziomu ekspresji genów naprawy DSB w komórkach linii pierwotnych glejaka wielopostaciowego również pozwoliła zaobserwować spadek ekspresji *LIG4* w badanych komórkach. Obniżony poziom *LIG4* został potwierdzony także na poziomie białka poprzez wykonanie analizy Western Blot. W badaniach odpowiedzi komórek na celowanie w szlak alternatywny wykorzystany został inhibitor PARP1 - talazoparyb. Związek podawano samodzielnie oraz w kombinacji ze związkiem alkilującym stosowanym w terapii glejaka - TMZ.

Zastosowanie w komórkach linii glejaka talazoparybu w kombinacji z TMZ wykazało znacznie bardziej toksyczny efekt, niż każdy ze związków zastosowany samodzielnie. Toksyczność dla prawidłowych astrocytów ludzkich była nieznaczna, nawet po inkubacji z drugą dawką związków (48h+72h). Badanie cytometryczne po barwieniu aneksyną V i jodkiem propidyny wykazało, że śmierć komórek nowotworowych z obniżoną ekspresją *LIG4* po inkubacji z inhibitorem PARP1 i związkiem alkilującym zachodzi poprzez apoptozę. Barwienie komórek kalceiną AM i jodkiem propidyny wykazało w mikroskopie fluorescencyjnym uszkodzenia błony komórkowej oraz obkurczanie i fragmentację komórek nowotworowych po zastosowaniu badanych związków.

Badanie rozmieszczenia komórek w fazach cyklu komórkowego wykazało akumulację potraktowanych związkami komórek glejaka w fazie subG1 odpowiadającej komórkom ulegającym śmierci, których DNA uległo fragmentacji przez endonukleazy. Nie obserwowano znaczących zmian w rozmieszczeniu prawidłowych astrocytów w fazach cyklu komórkowego.

Test klonogenności wykazał zupełne zatrzymanie podziałów komórek linii glejaka z obniżoną ekspresją *LIG4* po zastosowaniu kombinacji talazoparybu i TMZ. Jedynie TMZ zastosowany samodzielnie był w stanie znacząco obniżyć potencjał proliferacyjny linii glejaka wielopostaciowego.

Inkubacja komórek glejaka z kombinacją inhibitora ze związkiem alkilującym prowadziła ponadto do akumulacji toksycznych DSB.

Rola obniżonej ekspresji *LIG4* na wrażliwość komórek glejaka na inhibitor PARP1 została określona poprzez poddanie komórek jednej z linii transfekcji wektorem

przenoszącym cDNA dla *LIG4*. Podwyższenie wewnątrzkomórkowego poziomu *LIG4* spowodowało uzyskanie oporności na zastosowanie kombinacji talazoparybu i TMZ.

Dodatkowo, wyciszono ekspresję *PARP1* w wybranych liniach z obniżoną ekspresją *LIG4*, a komórki poddano następnie inkubacji ze związkiem alkilującym. Tak potraktowane komórki były bardziej wrażliwe na zastosowanie TMZ, niż komórki poddane transfekcji plazmidem kontrolnym (wyniki badań wykonanych w zagranicznym ośrodku przedstawione zostały w danych uzupełniających). Przeanalizowano również odpowiedź linii pierwotnych glejaka wykazujących poziom ekspresji *LIG4* zbliżony do komórek prawidłowych astrocytów. Po wyciszeniu ekspresji *PARP1* nie obserwowaliśmy znaczącego spadku żywotności komórek po inkubacji ze związkiem alkilującym.

Komórki glejaka z niskim i prawidłowym poziomem *LIG4* zostały również poddane transfekcji plazmidem kodującym dominujący negatywny mutant białka *PARP1* (E988K) nieaktywny katalitycznie. Tak potraktowane komórki z obniżoną ekspresją *LIG4* były bardziej wrażliwe na zastosowanie TMZ w porównaniu do komórek z prawidłowym poziomem *LIG4*, jak i w porównaniu do komórek poddanych transfekcji plazmidem kontrolnym (wyniki przedstawione w danych uzupełniających).

Podsumowanie i wnioski

Zważywszy na rosnącą wiedzę na temat zmian genetycznych i epigenetycznych zachodzących w komórkach nowotworowych, spersonalizowane podejście do terapii przeciwnowotworowej i terapia oparta o syntetyczną letalność zyskują sobie w ostatnich latach uwagę licznych grup badawczych. Chociaż w obecnej chwili jedynie zdolność inhibitorów *PARP1* do eliminacji komórek z mutacjami *BRCA1/2* znalazła zastosowanie kliniczne, to inhibitory *PARP1* mogłyby zostać wykorzystane w terapii spektrum innych typów nowotworów z defektami w szlakach naprawy DNA.

By przeanalizować terapeutyczne działanie strategii przeciwnowotworowej opartej o syntetyczną letalność w komórkach źle prognozujących guzów litych, od pacjentów wyprowadzono linie pierwotne czerniaka i glejaka. Wykrycie w nich obniżonej ekspresji *LIG4* pozwoliło nam postawić hipotezę, iż zastosowanie inhibitorów szlaku altNHEJ w kombinacji ze związkiem alkilującym doprowadzi do specyficznej eliminacji komórek

nowotworowych, bez toksycznego efektu na komórki prawidłowe, w których prawidłowo funkcjonuje szlak podstawowy NHEJ. LIG4 jest elementem biorącym udział w naprawie cNHEJ, a jej obniżona ekspresja może być źródłem nieefektywnej pracy tego szlaku i aktywacji alternatywnych ścieżek naprawy. Źródła obniżonej ilości LIG4 w komórkach nie są jeszcze dobrze poznane, jednak wstępne wyniki badań sugerują m.in. niewydajną pracę szlaków JAK2-STAT5 lub PI3K-AKT [15]. Niska ekspresja LIG4 była wcześniej wykrywana w liniach nerwiaka zarodkowego i korelowała z wyższym stadium choroby oraz niższym prawdopodobieństwem przeżycia pacjenta [16].

Zastosowanie kombinacji związku alkilującego i inhibitora PARP1 - olaparybu lub talazoparybu było skuteczne w selektywnej eliminacji komórek czerniaka i glejaka. Inkubacja z badanymi związkami doprowadzała do akumulacji DSB ponad naprawialny próg, zahamowania proliferacji komórek nowotworowych, zmian morfologicznych, a końcowo do zajścia apoptozy. Obniżony poziom LIG4 i zablokowanie alternatywnych ścieżek naprawy były bezpośrednimi czynnikami odpowiedzialnymi za powstanie wrażliwości na uszkodzenia wprowadzane przez związek alkilujący do komórek glejaka i czerniaka, gdyż przywrócenie ekspresji LIG4 powodowało podniesienie oporności komórek na dodawane związki. Zastosowanie inhibitora PARP1 ze związkiem alkilującym nie dawało efektu toksycznego w prawidłowych melanocytach i astrocytach.

Analiza bazy danych TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) wykazała, że obniżona ekspresja i mutacje *LIG4* są wykrywane w średnio 7% przypadków czerniaka i 4% glejaka wielopostaciowego, jednak całkowity udział mutacji czynników biorących udział w szlaku podstawowym NHEJ był znacznie większy. Może to sugerować, że potencjalnie znacznie szersza grupa pacjentów mogłaby skorzystać z terapii spersonalizowanej opartej o syntetyczną letalność między inhibitorami PARP1 a defektami szlaku cNHEJ.

Przeprowadzone badania sugerują możliwość zastosowania terapii opartej o syntetyczną letalność w celu selektywnej eliminacji komórek czerniaka i glejaka z obniżoną ekspresją LIG4. Niski poziom LIG4 i inhibicja PARP1, który bierze udział w szlaku alternatywnym NHEJ, naprawie pojedynczych pęknięć DNA oraz indukcji HR na zatrzymanych widełkach replikacyjnych, jest przyczyną akumulacji DSB ponad próg, który komórka jest w stanie naprawić. W komórkach prawidłowych funkcjonował szlak

kanonicznej naprawy cNHEJ, redukujący liczbę uszkodzeń wprowadzanych przez związki alkilujące.

Wnioski

- Obniżony poziom ekspresji LIG4 w komórkach linii pierwotnych czerniaka i glejaka wiązał się z ich wrażliwością na zastosowanie inhibitorów PARP1, szczególnie w kombinacji ze związkiem alkilującym, wzmacniającym efekt zahamowania alternatywnego szlaku naprawy;
- Badane związki prowadziły do gromadzenia DSB ponad naprawialny próg, znacząco obniżały potencjał proliferacyjny komórek oraz prowadziły do zmian morfologicznych i apoptozy;
- Przywrócenie ekspresji LIG4 w komórkach powodowało utratę wrażliwości na inhibitory;
- Zastosowane związki nie dawały efektu toksycznego w prawidłowych melanocytach i astrocytach, gdyż prawidłowo funkcjonował w nich mechanizm cNHEJ redukujący liczbę wprowadzanych przez związki alkilujące uszkodzeń.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74
2. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(9): 689-98
3. Weidle UH, Maisel D, Eick D. Synthetic lethality-based targets for discovery of new cancer therapeutics. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011; 8(4): 159-71
4. Wong SL, Zhang LV, Tong AH, Li Z, Goldberg DS, et al. Combining biological networks to predict genetic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(44): 15682-7
5. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 801-17

6. Cramer-Morales K, Nieborowska-Skorska M, Scheibner K, Padget M, Irvine DA, et al. Personalized synthetic lethality induced by targeting RAD52 in leukemias identified by gene mutation and expression profile. *Blood*. 2013; 122(7): 1293-304
7. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*. 2012; 47(4): 497-510
8. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84(2): 137-46
9. Malyuchenko NV, Kotova EY, Kulaeva OI, Kirpichnikov MP, Studitskiy VM. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae*. 2015; 7(3): 27-37
10. Mao Z, Jiang Y, Liu X, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells. *Neoplasia*. 2009; 11(7): 683-91
11. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(1): 9-29
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352(10): 987-96
13. Sztiller-Sikorska M, Hartman ML, Talar B, Jakubowska J, Zalesna I, et al. Phenotypic diversity of patient-derived melanoma populations in stem cell medium. *Lab Invest*. 2015; 95(6): 672-83
14. Slinker BK. The statistics of synergism. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30(4): 723-31
15. Maifrede S, Nieborowska-Skorska M, Sullivan-Reed K, Dasgupta Y, Podsiwyalow-Bartnicka P, et al. Tyrosine kinase inhibitor-induced defects in DNA repair sensitize FLT3(ITD)-positive leukemia cells to PARP1 inhibitors. *Blood*. 2018; 132(1): 67-77

16. Newman EA, Lu F, Bashllari D, Wang L, Opiari AW, et al. Alternative NHEJ Pathway Components Are Therapeutic Targets in High-Risk Neuroblastoma. *Mol Cancer Res.* 2015; 13(3): 470-82

Monika Tome

Summary

Introduction

One of the hallmarks of cancer cells is their genetic instability which might lead to increased generation of mutations in their genomes [1]. For that reason, there is an increased risk that loss of function mutations will arise in genes whose products are a part of mechanisms crucial for cell survival, e.g. DNA repair systems. Under such conditions, cancer cell's survival depends on finding a substitute for the lost pathway [2]. If inactivation of a specific set of genes leads to cell death, whereas inactivation of each of these genes individually does not affect cell functioning and survival, then these genes are considered to exhibit "synthetic lethal" interactions [3]. Targeting the alternative pathways using inhibitors and aptamers has become an attractive strategy gaining increasing interest in recent years. Synthetic lethality approach might not only prove to be a selective and effective solution in personalized anticancer therapy, but it is already contributing to expanding the knowledge about genetic interactions occurring in cells [4].

Double strand breaks (DSBs) might arise due to an exposition to factors like ionizing radiation, reactive oxygen species or genotoxic stress e.g. due to chemotherapy [5]. Unrepaired DSBs can lead to genetic rearrangements and tumor progression. It has been suggested that inactivating mutations of genes involved in DSB repair and activation of a back-up pathway is a source of the therapy-refractory character of some cancer cells [6]. In normal cells in G1/S phase of the cell cycle DSBs are repaired via non-homologous end joining (NHEJ), whereas homologous recombination (HR) mechanism repairs DSBs during G2 and late S phase. What is more, two subsystems (canonical and alternative) can be distinguished for both NHEJ and HR. The canonical NHEJ (cNHEJ) pathway depends on DNA-PKcs protein, however, if any protein crucial for cNHEJ is absent and the mechanism is not able to perform efficiently, its functions are redirected to the alternative pathway (altNHEJ) basing on PARP1 [7]. PARP1 is involved not only in DSB repair but also participates in repair of DNA single-strand breaks and induces HR at stalled replication forks [8]. Repair by HR bases on interactions between BRCA1/2 and RAD51, however, it has been suggested that cells carrying inactivating *BRCA1/2* mutations rely on alternative pathway depending on RAD52 and RAD51 [6]. Loss of function mutations in canonical pathway

genes can create conditions for the selective elimination of cancer cells with alternative pathway inhibitors. At present, only PARP1 inhibitors have found an application in personalized therapy based on synthetic lethality. PARP1 inhibition in cells carrying *BRCA1/2* mutations lead to inefficient DNA damage repair by PARP1-dependent mechanism and leads to the inversion of lesions to DSBs, which in turn cannot be repaired efficiently due to the mutations inactivating BRCA1/2-HR pathway. Such conditions may further lead to the accumulation of toxic DSB, aggravation of genetic instability and cell death [9]. Although NHEJ system is the predominant DSB repair mechanism in eukaryotic cells, some types of cancer seem to rely mostly on HR, therefore its inactivation can exert a strongly toxic effect on cancer cells [10].

The aim of this research was to identify new synthetic lethality interactions within primary cell lines of melanoma and glioblastoma. Although at the early stages melanoma can be successfully cured, cancer progression and especially metastasis to other organs usually significantly worsen median survival (< 9 months) [11]. Glioblastoma multiforme on the other hand is one of the most commonly occurring cancer types in the central nervous system, and often despite the use of aggressive therapeutic approach survival rate median stays below 14.6 months [12]. The aim of the research presented in this thesis was to analyze the expression level of DSB repair genes in each glioblastoma and melanoma case. Basing on the created profile 'repair mechanism vulnerabilities' were identified which could be utilized to create a personalized approach using inhibitors targeting alternative DSB repair pathways.

Aim of the study

The main aim of this study was to investigate the response of primary glioblastoma and melanoma cell lines expressing reduced level of proteins involved in DSB repair, to the treatment with inhibitors of the alternative DSB repair pathways. This aim was achieved by:

1. Establishment of primary cell lines from surgical specimens of solid tumors and confirmation of the obtained cell line's characteristics using surface and genetic markers;
2. Determination of the expression level of genes whose products are involved in DSB repair systems (*BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, homologs of *RAD51*, *RAD52* - HR; *DNA-PKcs*, *XRCC5*, *XRCC6*, *LIG4* - cNHEJ; *PARP1*, *LIG3* - altNHEJ) and comparison of their level

to expression in normal cells. Identification of the "weak points" in DSB repair systems in cancer cells and selection of the inhibitors that could lead to cell's synthetic lethality;

3. Evaluation of cancer and normal cell's response to the treatment with selected inhibitors used alone or in combination with the alkylating compounds currently in use in the therapy of selected types of cancer.

The conducted research will let us identify correlations between the expression profile of genes encoding DSB proteins and cancer cell's sensitivity to the approach based on synthetic lethality strategy.

Materials and methods

The subject of this study were glioblastoma and melanoma primary cell lines. Melanoma specimens classified as clinical stages III and IV were acquired from patients of the Clinic for Oncological Surgery, Copernicus Memorial Hospital, Medical University of Lodz. DMBC 2, DMBC 8, DMBC 10, DMBC 11, DMBC 12 melanoma cells were isolated from samples in the Department of Cancer Molecular Biology, Medical University of Lodz, and the presence of cancer cells in the established cultures was confirmed by cytometric analysis of surface markers specific for melanoma cells and cancer stem cells [13]. The primary melanoma cell lines obtained by the team were shared with us for further research on personalized anticancer therapy. The cells were grown in the form of three-dimensional melanospheres, which, compared to the monolayer culture system better reconstitute the structure of the tumor and the heterogeneity of its cell population.

Samples of glioblastoma multiforme classified as clinical stages III and IV were obtained from patients of the Department of Neurosurgery, Copernicus Memorial Hospital, Medical University of Lodz and Department of Neurosurgery, Surgery of Spine and Peripheral Nerves, University Hospital WAM-CSW, Medical University of Lodz. The research gained approval from the Bioethical Commission of the Medical University of Lodz (approval No. RNN / 194/12 / EC). H3, H6 and H7 glioblastoma cells were isolated from surgical specimens at the Department of Molecular Genetics at the University of Lodz. Cell lines were sorted using magnetic beads MACS (Magnetic-Activated Cell Sorting) detecting the surface antigen CD133, which is a marker of the cancer stem cells. In addition, to

confirm the presence of glioblastoma cells in the obtained culture, an analysis of loss of heterozygosity (LOH) at the chromosomal locus 10q23-24, 10p14 and 22q12.3 was performed. Detection of the genetic changes in at least one of these locations is considered a common change characteristic for glioblastomas. LOH were compared between peripheral blood samples, tumor bulk obtained from patient and established cell line. LOH10q was detected in all tested lines, showing an approximately 50% decrease in the tumor samples and a 65-70% decrease in the derived cell lines compared to the peripheral blood. This suggests that the 10q mutation characteristic for glioblastoma was propagated in the established culture. Normal human epidermal melanocytes (NHEM) and normal human astrocytes (NHA) commercial cell lines were used as a control for the experiments.

Analysis of the expression of the genes whose products are involved in DSB repair began with the isolation of total RNA from each of the tested lines. In the next step, reverse transcription was performed in order to translate mRNA into cDNA. Polymerase chain reaction with real-time detection was carried out using TaqMan probes detecting genes *BRCA1*, *BRCA2*, *LIG3*, *LIG4*, *PALB2*, *PARP1*, *PRKDC*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *XRCC2*, *XRCC3*, *RAD52*, *XRCC5*, *XRCC6*. Their expression was normalized to the *18S rRNA* reference gene. Fold change of the gene expression was calculated as compared to NHEM (for melanoma lines) or NHA (for glioma lines). Western Blot was performed for genes selected from the previous experiment in order to confirm their expression at the protein level.

Two cell lines of each tumor type were selected for the experiments of the cell response to the compounds utilizing the synthetic lethality approach. The decision was made basing majorly on the level of expression of DSB repair genes and proteins, however, the ease of culture and the rate of cell divisions were also considered. Cell response was studied after using PARP1 inhibitors - olaparib (AZD2281) in melanoma and talazoparib (BMN673) in glioblastoma cell lines, alone or in combination with an alkylating compound currently used in the treatment of the selected cancer type - dacarbazine (DTIC) for melanoma or temozolomide (TMZ) in glioblastoma. The use of the PARP1 inhibitor in combination with DTIC or TMZ in cells with reduced *LIG4* expression was intended to block the altNHEJ alternative pathway and to generate sensitivity to the DNA damage introduced by the

alkylating compound. The cells were incubated with the treatment variants for 48h, after which some cells were collected for the first experiments, and the remaining cells received a second dose of compounds with which they were incubated for 72h more.

The study of the therapeutic effect of the tested compounds on melanoma cell viability was conducted using flow cytometry and propidium iodide staining. In glioblastoma cells, a cytometric analysis was performed after cell staining with propidium iodide and annexin V. The use of a combination of fluorescent dyes not only allowed identification of dead cells but also allowed to distinguish cell death pathway. Annexin V stains phosphatidylserine, which appears outside the cell membrane in the early stages of apoptosis. Propidium iodide stains DNA by penetrating cells through the fragmented cell membrane. This is a characteristic change occurring in necrosis and late stages of apoptosis.

In glioblastoma primary cell lines fluorescent microscopy was used to analyze the morphological changes occurring in the cells after incubation with the compounds. Cells were stained with calcein AM and propidium iodide. Calcein AM can penetrate living cells, where it is degraded into calcein, which gives strong green fluorescence when excited. Propidium iodide stains the DNA of dead cells that demonstrate low plasma membrane integrity. To analyze the effect of compounds on the distribution of glioma and melanoma cell lines in the cell cycle phases, the cytometric analysis was performed after propidium iodide + RNase staining.

The ability of tumor cells to proliferate was tested using clonogenic assay. The method tests the ability of each individual cell to undergo divisions and form a colony. NHEM and NHA normal cells do not have the ability to grow in soft agar, therefore the untreated cancer cells constituted control for the experiment.

The analysis of DSB accumulation in melanoma cells was performed in ELISA assay detecting phosphorylated histone γ H2A.X by specific antibodies. In studies on primary glioblastoma cell lines, the level of phosphorylated histone γ H2A.X was tested by cytometric identification of Alexa Fluor 647 Mouse Anti-H2A.X (pS139) antibody - stained cells. The results of tests detecting phosphorylation of γ H2A.X histone were confirmed by performing a neutral comet test that recognizes DSB.

To confirm the hypothesis and increase intracellular level of LIG4, glioma and melanoma cell lines with reduced LIG4 expression were transfected with plasmid pCMV6-AC-GFP-LIG4. The cells transfected with an empty plasmid constituted a control. GFP⁺ cells were sorted and exposed to the tested compounds for 48 hours. Cell viability was calculated after trypan blue staining. The next model were the parental NALM6 and NALM6 LIG4 ^{-/-} lines, which were treated with olaparib and viability was counted after trypan blue staining. Glioblastoma cells with reduced LIG4 expression as well as cells with normal LIG4 level were subjected to PARP1 silencing using siRNA. The cells transfected with control plasmid (siRNA non-targeting control) constituted a negative control for the experiment. A kit for silencing GAPDH gene expression in cells was used as a positive control. After transfection of cells with given plasmids, the decrease in expression of the tested mRNA was analyzed. Cells were incubated with temozolomide (TMZ) for 48 hours. Glioblastoma cells were also transfected with plasmid pMIG-mCherry-PARP1(E988K) encoding catalytically inactive dominant negative mutant (E988K) of PARP1. mCherry⁺ cells were sorted and incubated 48h with TMZ. Cell viability after treatment with compounds was analyzed by trypan blue staining and compared to a negative control.

The results were obtained in triplicates and presented as mean \pm SD. The results were compared using an unpaired Student's t-test. P values <0.05 were considered statistically significant. The synergistic effect of compounds has been analyzed using the additivity approach - two-way ANOVA [14].

Preliminary *in vivo* studies have also been performed on NSG (NOD scid gamma) mice xenografts of the primary DMBC11 melanoma cell line. The cells were administered subcutaneously, and when tumor growth was observed, the compounds were administered. The studies were carried out on 4 groups denoting variants of the administered compounds (control, olaparib, DTIC, olaparib + DTIC) - 6 mice per group.

Results

Analysis of the expression profile of genes whose products are involved in DSB repair showed a reduced level of *LIG4* in melanoma cells compared to normal melanocyte cells. LIG4, together with its interaction partner - XRCC4, performs end joining in cNHEJ

pathway. Its reduced level may lead to inefficient DSB repair by cNHEJ and activation of the alternative pathway - altNHEJ.

PARP1 inhibitor olaparib was used in order to suppress the alternative mechanism. The alkylating agent DTIC was administered in combination with PARP1 inhibitor to strengthen the toxic effect of altNHEJ inactivation, creating sensitivity to damage introduced by the alkylating compound. Two primary melanoma cell lines - DMBC 11 and DMBC 12 were selected for the analysis of cell response. Cytometric analysis after propidium iodide staining revealed specific elimination of melanoma cells when olaparib was used together with DTIC. After 48 hours of incubation, only the combination of compounds reduced the viability of melanoma cells, however, administration of a second dose and incubation for another 72h resulted in a further decrease in cell viability. The same treatment of normal NHEM melanocytes did not exert a toxic effect even after a 5-day incubation.

The examination of cell distribution in the phases of the cell cycle did not show significant changes in its course after incubation with tested compounds. A slight increase in the cell population in the G2/M phase was only observed after treatment with the combination of compounds.

Analysis of the proliferative potential of melanoma cells showed almost complete arrest of cell divisions after treatment with PARP1 inhibitor in combination with DTIC. Compounds used alone led only to average 30-45% reduction of divisions.

The level of phosphorylated histone γ H2A.X, which is a marker of ongoing DSB repair, did not increase in normal NHEM melanocytes cells treated with PARP1 inhibitor and DTIC alone and in the combination, however in DMBC11 and DMBC12 melanoma cell lines combination of the compounds resulted in respectively 5- and 2-fold increase in DSB amount. Accumulation of DSB in melanoma cells was even more significant in performed comet assay under neutral conditions.

In vivo studies conducted on primary DMBC11 melanoma cell line xenografts in NSG mice showed a slight but statistically significant reduction in tumor mass after combination of PARPi and alkylating agent was administered for 24 days. These results are considered to be only preliminary, and further protocol optimization might allow obtaining a stronger effect.

The hypothesis that melanoma cell elimination is caused by synthetic lethality interactions between LIG4 and PARP1 has been verified by increasing LIG4 expression in melanoma cells using a plasmid vector carrying cDNA for LIG4. LIG4-enriched cells exhibited reduced sensitivity to olaparib compared to cells transfected with the control plasmid. Also, NALM6 leukemia cells with the LIG4^{-/-} knockout were much more sensitive to olaparib than parental cells expressing LIG4.

Analysis of the expression level of DSB repair genes in the primary glioblastoma multiforme cell lines also demonstrated a decreased expression of LIG4 in the tested cells. The reduction of the LIG4 level was also confirmed by performing Western Blot analysis. PARP1 inhibitor - talazoparib was used to investigate cell response to the alternative pathway targeting. The compound was administered alone and in combination with an alkylating agent - TMZ used in the treatment of glioblastoma patients.

The use of talazoparib in combination with TMZ exerted significantly more toxic effect than any of the compounds used alone. Toxicity to normal human astrocytes was slight to none, even after incubation with the second dose of compounds (48h + 72h). Cytometric analysis after staining with annexin V and propidium iodide showed that the death of analyzed cancer cells after incubation with a PARP1 inhibitor + TMZ occurs through apoptosis. Fluorescent microscopy after staining with calcein AM and propidium iodide showed cell membrane damage, shrinking and fragmentation of tumor cells occurring after the application of tested compounds.

Analysis of glioblastoma cells distribution in the cell cycle phases showed the accumulation of compound-treated glioblastoma cells in the subG1 phase corresponding to dead cells whose DNA was fragmented by nucleases. No significant changes in the distribution of normal astrocytes in the phases of the cell cycle were observed.

Clonogenic assay demonstrated the complete abolishment of glioblastoma cell division after treatment with a combination of talazoparib and TMZ. Only TMZ used alone was able to significantly reduce the proliferative potential of glioblastoma multiforme primary cell line.

Incubation of glioblastoma cells with the combination of the inhibitor and the alkylating compound also led to a significant accumulation of the toxic DSBs.

The role of reduced LIG4 expression on the sensitivity of glioblastoma cells to the PARP1 inhibitor was determined by cell transfection with an expression vector carrying cDNA for LIG4. Increasing intracellular LIG4 levels resulted in resistance to the combination of talazoparib and TMZ.

Also, PARP1 expression was silenced in selected lines with reduced LIG4 expression, and the cells were then incubated with the alkylating compound. Cells with PARP1 silenced were more sensitive to TMZ than cells transfected with the control plasmid (results in the supplementary data). The response of glioma primary cell lines exhibiting a level of LIG4 similar to normal astrocyte cells was also analyzed. After silencing PARP1 expression we did not observe a significant decrease in cell viability after incubation with the alkylating compound.

Glioblastoma cells with low and normal LIG4 expression were also transfected with a plasmid coding dominant-negative PARP1 (E988K) mutant. Cells with reduced LIG4 expression which were expressing catalytically inactive PARP1 were more sensitive to TMZ when compared to cells with normal LIG4 levels (results in the supplementary datas).

Resume and conclusions

Growing knowledge of genetic and epigenetic changes occurring in cancer cells resulted in an increasing interest in synthetic lethality and a personalized approach to anticancer therapy. Although at the present moment only ability of PARP1 inhibitors to eliminate BRCA1/2-deficient cells found clinical application, PARP1 inhibitors could be potentially utilized for the treatment of different cancer types expressing defects in DNA repair pathways.

In order to analyze the therapeutic effect of an anticancer therapy based on synthetic lethality in cells of solid tumors, glioblastoma and melanoma primary cell lines were derived from surgical specimens. Detection of low LIG4 expression in given cell lines allowed us to hypothesize that the use of altNHEJ inhibitors in combination with an

alkylating compound will lead to selective elimination of cancer cells, with no toxic effect on normal melanocytes and astrocytes in which cNHEJ functions properly. LIG4 is involved in the end ligation step in cNHEJ and its reduced level might be a reason for ineffective repair by cNHEJ and activation of a back-up repair mechanism. The sources of the reduced level of LIG4 in cells are not yet well understood, however, preliminary research results suggest inefficient JAK2-STAT5 or PI3K-AKT pathway activity [16].

The combination of alkylating agent and PARP1 inhibitors - olaparib or talazoparib was effective in the selective elimination of melanoma and glioblastoma cells. Treatment with the tested compounds led to the accumulation of DSBs above the repairable threshold, inhibited proliferative potential of tumor cells, resulted in morphological changes and apoptosis. Reduced expression of LIG4 and inhibition of the alternative repair pathway were directly responsible for the emergence of the cellular sensitivity to damage induced by an alkylating agent to glioblastoma and melanoma cells. Restoration of LIG4 expression resulted in increased resistance to analyzed compounds. Using PARP1 inhibitor with an alkylating compound did not have a toxic effect on normal melanocytes and astrocytes.

The analysis of the TCGA database (The Cancer Genome Atlas) shows that reduced expression and mutations of LIG4 are detected in average in 7% melanoma and 4% glioblastoma cases, however, the total percentage of general cNHEJ mutation was significantly higher. This discovery might suggest that potentially a wider group of patients could benefit from personalized anticancer therapy based on synthetic lethality between PARP1 inhibitors and cNHEJ pathway defects.

The results of the conducted research suggest the therapeutic effect of the approach based on targeting PARP1 in order to selectively eliminate melanoma and glioma cells with reduced LIG4 expression. Downregulation of LIG4 and inhibition of PARP1 which is involved in altNHEJ, DNA single-strand break repair and induction of HR at stalled replication forks, caused DSB accumulation and led to cancer cell death. In normal cells, cNHEJ repair pathway operated properly reducing the number of DNA lesions introduced by an alkylating agent.

Conclusions

- The decreased expression level of LIG4 in melanoma and glioblastoma primary cell lines was associated with their sensitivity to PARP1 inhibitors, especially when applied in combination with an alkylating compound which enhanced the result of alternative pathway inhibition;
- Compounds led to the accumulation of DSBs above the repairable threshold, significantly reduced cell proliferative potential, and led to morphological changes and apoptosis;
- Restoration of LIG4 expression in cells resulted in the loss of sensitivity to the treatment;
- Used compounds did not affect normal melanocytes and astrocytes, because the cNHEJ mechanism which functioned correctly, reduced the number of damage introduced by alkylating compounds.

References

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144(5): 646-74
2. Kaelin WG Jr. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(9): 689-98
3. Weidle UH, Maisel D, Eick D. Synthetic lethality-based targets for discovery of new cancer therapeutics. *Cancer Genomics Proteomics*. 2011; 8(4): 159-71
4. Wong SL, Zhang LV, Tong AH, Li Z, Goldberg DS, et al. Combining biological networks to predict genetic interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(44): 15682-7
5. Curtin NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12(12): 801-17
6. Cramer-Morales K, Nieborowska-Skorska M, Scheibner K, Padget M, Irvine DA, et al. Personalized synthetic lethality induced by targeting RAD52 in leukemias identified by gene mutation and expression profile. *Blood*. 2013; 122(7): 1293-304

7. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*. 2012; 47(4): 497-510
8. De Vos M, Schreiber V, Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84(2): 137-46
9. Malyuchenko NV, Kotova EY, Kulaeva OI, Kirpichnikov MP, Studitskiy VM. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae*. 2015; 7(3): 27-37
10. Mao Z, Jiang Y, Liu X, Seluanov A, Gorbunova V. DNA repair by homologous recombination, but not by nonhomologous end joining, is elevated in breast cancer cells. *Neoplasia*. 2009; 11(7): 683-91
11. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*. 2014; 64(1): 9-29
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005; 352(10): 987-96
13. Sztiller-Sikorska M, Hartman ML, Talar B, Jakubowska J, Zalesna I, et al. Phenotypic diversity of patient-derived melanoma populations in stem cell medium. *Lab Invest*. 2015; 95(6): 672-83
14. Slinker BK. The statistics of synergism. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30(4): 723-31
15. Maifrede S, Nieborowska-Skorska M, Sullivan-Reed K, Dasgupta Y, Podsiywalow-Bartnicka P, et al. Tyrosine kinase inhibitor-induced defects in DNA repair sensitize FLT3(ITD)-positive leukemia cells to PARP1 inhibitors. *Blood*. 2018; 132(1): 67-77
16. Newman EA, Lu F, Bashllari D, Wang L, Opiari AW, et al. Alternative NHEJ Pathway Components Are Therapeutic Targets in High-Risk Neuroblastoma. *Mol Cancer Res*. 2015; 13(3): 470-82

Movibe Tome